



2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

013581395

WPI Acc No: 2001-065602 /200108

XRAM Acc No: C01-018668

XRPX Acc No: N01-049574

Monoclonal antibody capable of binding specific serotypes of adenovirus, useful for detecting adenovirus and diagnosing conditions associated with adenovirus infection

Patent Assignee: TOA GOSSEI CHEM IND LTD (TOAG)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2000290298	A	20001017	JP 9998474	A	19990406	200108 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9998474 A 19990406

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2000290298	A	7	C07K-016/08	

Abstract (Basic): JP 2000290298 A

NOVELTY - A monoclonal antibody specific to adenovirus serotypes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 19, and 37, especially 3, 4, 8, 19 and 37 which does not react with any other virus, is new.

USE - (I) is useful for detecting adenovirus in a sample for diagnosis of conjunctivitis, viral pneumonia, epidemic keratoconjunctivitis.

ADVANTAGE - The monoclonal antibody detects a wide range of serotypes of adenovirus and has high sensitivity. The antibody can be used for detecting adenovirus by all detection methods, including EIA (not defined), RIA (radio immunoassay) fluorescent antibody techniques and immunoelectrophoresis.

pp; 7 DwgNo 0/0

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - BIOTECHNOLOGY - Preparation: (I) is obtained from hybridoma produced by fusing mouse myeloma cells and spleen cells of mouse immunized with adenovirus 3, 4, 8, 19 and 37.

Preferred Antibody: (I) has an absorbance of 0.40 or more at 490 nm, when measuring the reactivity opposing to adenovirus 3, 4, 8, 19 and 37 by ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Title Terms: MONOCLONAL; ANTIBODY; CAPABLE; BIND; SPECIFIC; ADENOVIRUS; USEFUL; DETECT; ADENOVIRUS; DIAGNOSE; CONDITION; ASSOCIATE; ADENOVIRUS; INFECT

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C07K-016/08

International Patent Class (Additional): C12N-005/10; C12P-021/08;

G01N-033/569; G01N-033/577

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-F11; B04-G08; B04-G21; B04-L01; B11-C07A; B11-C07A4; B11-C07A5; B12-K04A; B12-K04A4; B14-K01; B14-N03; D05-H09; D05-H11A1.

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M430 M710 M781 M782 M905 N102 P831 Q233 RA00C8-D RA00C8-M RA00C8-N RA00C8-U

02 M423 M750 M905 N102 Q233 RA00GT-K RA00GT-A

03 M423 M430 M782 M905 N102 P831 Q233 RA00GC-K RA00GC-D RA00GC-M

Chemical Fragment Codes (M6):

04 M905 P820 P831 P922 Q233 R501 R502 R515 R521 R621 R624 R625 R627 R635

Specific Compound Numbers: RA00C8-D; RA00C8-M; RA00C8-N; RA00C8-U; RA00GT-K; RA00GT-A; RA00GC-K; RA00GC-D; RA00GC-M

Key Word Indexing Terms:

01 184587-0-0-0-CL, NEW, USE 200757-0-0-0-CL, DET 184598-0-0-0-CL

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-290298

(P2000-290298A)

(43) 公開日 平成12年10月17日 (2000. 10. 17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 K 16/08		C 0 7 K 16/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/569	L 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/569		33/577	B
33/577		C 1 2 N 5/00	B
		審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)	

(21) 出願番号 特願平11-98474

(22) 出願日 平成11年4月6日 (1999. 4. 6)

(71) 出願人 000003034

東亜合成株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72) 発明者 直江 智子

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式
会社つくば研究所内

(72) 発明者 松尾 克彦

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式
会社つくば研究所内

(72) 発明者 東 隆親

千葉県野田市山崎2361-1

(72) 発明者 今井 由美

神奈川県横浜市金沢区平潟町28-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アデノウイルスに反応するモノクローナル抗体及びこれを用いたアデノウイルス検出法

(57) 【要約】

【課題】 血清型アデノウイルス、特にプロトタイプのアデノウイルスばかりではなく、臨床分離株とも高感度に反応するモノクローナル抗体の提供。

【解決手段】 アデノウイルス血清型1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 19及び37型と反応し、特に3, 4, 8, 19及び37型のいずれに対しても共通して高い反応性を示すがアデノウイルス以外のウイルスに反応しないモノクローナル抗体の取得。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アデノウイルス血清型1、3、4、5、6、7、8、11、19及び37型と反応し、アデノウイルス3、4、8、19及び37型に対しては高い反応性を示すがアデノウイルス以外のウイルスには反応しないことを特徴とするアデノウイルスに反応するモノクローナル抗体。

【請求項2】 アデノウイルス3、4、8、19及び37型混合物により免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞とを融合することによって得られるハイブリドーマにより産生されたものであることを特徴とする請求項1記載のアデノウイルスに反応するモノクローナル抗体。

【請求項3】 アデノウイルス3、4、8、19及び37型に対する反応性をELISA法で測定したときの吸光度 OD_{490nm} が0.40以上であることを特徴とする請求項1記載のアデノウイルスに反応するモノクローナル抗体。

【請求項4】 請求項1記載のアデノウイルスに反応するモノクローナル抗体を用いることを特徴とするアデノウイルス検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、広範囲の血清型のアデノウイルスに高感度に反応するモノクローナル抗体に関するものであり、当該抗体はアデノウイルスの検査及び診断に利用できるものであり、本発明は疾病の検査及び診断技術に属するものである。

【0002】

【従来技術】アデノウイルスは、急性熱性咽頭炎、咽頭結膜炎、急性気道炎、ウイルス性肺炎、急性汎胞性結膜炎、流行性角結膜炎などの病原体として知られる。現在ヒトアデノウイルスとしては47の血清型が知られているが、今後さらに臨床株では変異を起こし、血清型の種類は増加する可能性があるものである。アデノウイルスはヒトに感染した場合、多彩な臨床症状を呈し、特異的な病状が少ない為、臨床症状からアデノウイルスの感染を証明することは困難である。また、アデノウイルスの感染性は高く、集団感染を防ぐ為には早期にウイルスの感染を証明する事が必要とされている。現在、アデノウイルスの検出同定には分離培養—中和法あるいはPCR-RFLP法が使用されているが、分離培養—中和法は判定までに2週間という長期間が必要であり、また、PCR-RFLP法は感染力を保持していた病原体の証明とはならないという問題をそれぞれ有している。また、迅速かつ簡便にアデノウイルスを検出する方法として抗アデノウイルス抗体を用いた免疫クロマト法やEIAを用いた方法も開発されているが、採取できる試料の量が少ない眼科領域での陽性率は60%以下というものであり、より高感度の迅速診断法またはこれに用いることのできる抗アデノウイ

ルスモノクローナル抗体が求められている。なお、アデノウイルスに対するモノクローナル抗体及びこれを用いたアデノウイルス検出法に関する代表的先行技術としては以下の文献に記載のものが挙げられる。

<1> Application of a Solid-Phase Immunofluorometric Assay to the Selection of Monoclonal Antibody Specific for the Adenovirus Group-Reactive Hexon Antigen, Arch-Virol.1984;80, 1-10,

<2> Comparison of Time-Resolved Fluoroimmunoassay with Monoclonal Capture-Biotinylated Detector Enzyme Immunoassay for Adenovirus Antigen Detection, J-Clinical Microbiology, 1987 Sept,1662-1667,

<3> Characterization of adenovirus hexons by the ir epitope composition, Arch-Virol.1996;141:1891-1907,

<4> Rapid diagnosis of adenovirus pharyngoconjunctival fever;use of a monoclonal antibody-based ELISA test during an outbreak, J-Virol-Methods,1989, Jun;24(3):307-12,

<5> Adenovirus Hexon Monoclonal Antibody That Is Group Specific and Potentially Useful as a Diagnostic Reagent, J-Clinical Microbiology, 1983Feb, 360-364,

【0003】

【発明が解決しようとする課題】現在アデノウイルスに対するモノクローナル抗体は上記先行文献に記載されているとおり多数作製されているが、いずれもアデノウイルスの検出の感度は十分ではなく、多くの血清型アデノウイルス、特にプロトタイプのアデノウイルスばかりではなく、臨床分離株とも高感度に反応するモノクローナル抗体が求められている。本発明者等はそれらの要望に答えるべく研究を行ったのである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、広範囲の血清型のアデノウイルスに高い反応性を有するモノクローナル抗体を作製するために種々検討を行ったところ、3、4、8、19及び37型という5種類のアデノウイルス抗原を混合してマウスの免疫を行って取得したモノクローナル抗体が広範囲の血清型アデノウイルスに反応するものであることを見出して本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明はアデノウイルス血清型1、3、4、5、6、7、8、11、19及び37型と反応し、アデノウイルス3、4、8、19及び37型に対しては高い反応性を示すがアデノウイルス以外のウイルスには反応しないことを特徴とするアデノウイルスに反応するモノクローナル抗体に関するものであり、さらに、本発明は前記モノクローナル抗体がアデノウイルス3、4、8、19及び37型混合物により免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞とを融合することによって得られるハイブリドーマにより産生されたもので

あることを特徴とするモノクローナル抗体、前記モノクローナル抗体がアデノウイルス3、4、8、19及び37型に対する反応性をELISA法で測定したときの吸光度 OD_{490nm} が0.40以上であることを特徴とするモノクローナル抗体、ならびに前記モノクローナル抗体を用いることを特徴とするアデノウイルス検出方法に関するものである。

【0006】

【実施例】以下、実施例に基いて、本発明を詳細に説明する。

○ 抗アデノウイルスモノクローナル抗体の作製

(1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

アデノウイルス臨床株、Ad3x、Ad4x、Ad8x、Ad19x、Ad37xの5種類を、それぞれHEp-2細胞を用いて培養し、細胞変性効果(CPE)+++となったものを、60℃にて2時間処理にて不活化したものを免疫抗原(以下不活化抗原)とし、3～10週齢のBALB/Cマウス(♀)の腹腔内にフロイドの完全アジュバントとともに投与する。以後2週間ごとに不活化抗原をフロイドの不完全アジュバントとともに腹腔内投与を2～5回繰り返す。細胞融合に供するにあたって、免疫したマウスに融合処理の3～4日前に不活化抗原を腹腔内投与し最終免疫とする。細胞融合当日に脾臓を摘出し、脾細胞を調製する。すなわち、脾臓をIscoe's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)中で細断し、メッシュを通して細分化し、1000rpm、5分間遠心して上清を捨てIMDMで洗浄を3回くりかえして、融合用脾細胞として提供する。

(2) ミエロマ細胞の調製

マウス由来のNS-1(ATCC名称:P3/NS1/1/Ag4-1)細胞株を正常培地で培養し、細胞融合時に 2×10^7 以上の細胞を得、細胞融合に親株として供した。

(3) ハイブリドーマの作製

(1)と(2)で得られた脾細胞とミエロマ細胞を、5～10:1の割合となるように混合し、1000rpm、5分間遠心した後上清を捨て、沈殿した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら37℃で50%ポリエチレングリコール(PEG1000～5000)1mlを1分間かけて加え、さらにIMDM1～2mlを数回加えて全量が20mlになるまで加える。1000rpm×5分間遠心した後、上清を捨て、フィーダー細胞として用意しておいたBALB/cマウス胸腺細胞 1×10^8 個を加え、緩やかにほぐした後、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、メジソン)培地/[IMDM、牛胎児血清(FCS)20%]を200mlを加え、メスピペットによる吸い込み、吹き出して緩やかに細胞を懸濁する。この懸濁液を96well培養用マイクロプレートに100μlずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中37℃で24時間培養する。以後、培養液が黄色味を帯びてきたwellが出現したら、約2日間ごとに、培養上清100μlを捨て新たなHAT培地100μlを加える。この操作を10日～14日間繰り返しながら5

%CO₂インキュベーター内で、37℃で培養する。この間培地交換をする際に、得られる培養上清を次に示すELISAに供し、アデノウイルス3、4、8、19及び37型何れにもに反応する抗体を産生しているwellを選択する。

【0007】○ スクリーニング方法

Ad3x、Ad4x、Ad8x、Ad19x、Ad37xの不活化精製ウイルス2μg/ml/PBS混合溶液を96穴マイクロタイタープレートに50μl/well分注し、室温1時間以上または4℃一晚以上静置して感作した後、0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄し、1%BSA/PBSでブロッキングする。この抗原感作プレートに、抗体を含むと思われる試料溶液50μl/wellを分注し、室温1時間以上または4℃一晚以上反応させる。反応後、0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgGをPBSで適正濃度に希釈し、50μl/wellを分注し、室温1時間反応させ再び0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄する。ペルオキシダーゼの基質であるオルトフェニレンジアミンを100μl/well分注して5分～30分発色させた後、2N-H₂SO₄100μl/wellを加えて反応を停止し、分光光度計にて490nmでのOD値を測定し、一定以上の発色を示したものを陽性とする。ELISAにて陽性とみなされ、すなわちアデノウイルス3x、4x、8x、19x、37x型のいずれかに反応する抗体を産生しているwellであり、かつ、コロニー状に生育してきたハイブリドーマの認められるwellについて、限界希釈法によりクローニングを行い、安定してアデノウイルス3x、4x、8x、19x、37x型全てに強い抗体価の認められたものを広範囲の血清型のアデノウイルスに反応するモノクローナル抗体として選択した。なお、選択できたものは、培地を徐々にHT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、メジソン)培地へと変換し、さらに正常培地へと変換する。このようにして、それぞれ1匹のマウスから(C9、C14、C27)の3種類のモノクローナル抗体と、3匹分の脾臓をまとめて細胞融合を行ったものから(C41)の1種類のモノクローナル抗体を得た。得られたモノクローナル抗体は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、それぞれC9:FERM P-17354、C14:FERM P-17355、C27:FERM P-17356、C41:FERM P-17357として受託された。

【0008】○ モノクローナル抗体の大量作製

プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)0.5mlを腹腔内投与し、2～4週間飼育した8～10週令のマウス(BALB/c,♀)に、(3)で得られた抗アデノウイルスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を $2 \sim 10 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内投与する。10～21日でハイブリドーマは腹水癌化するので、このマウスから腹水を採取し、遠心分離(3000rpm×5分)して固形分を除き上清液をProteinAカラムに通過させ、その吸着画分を集め、精製モノクローナル抗体IgG画分とし、280nmで

の吸光度測定によりIgG濃度を決定した。

【0009】○ C9、C14、C27、C41の反応性

このようにして得られたC9、C14、C27、C41のアデノウイルスに対する反応性を次の2つの方法で調べた。

方法1

ELISA法1

6種類のアデノウイルス抗原(Ad3x、Ad4x、Ad8x、Ad19、Ad37x)の臨床分離株及びプロトタイプAd37p)を96穴マイクロタイタープレートに結合する操作を行った。ここで用いたアデノウイルス抗原は何れもセシウム遠心により精製されており、横浜市立大学医学部眼科学教室より入手した。いずれも60℃にて2時間加熱して不活化処理がされておりBCA法によりヘキサソタンパク濃度は決定されていた。各臨床分離株の名称は以下の通りである。

Ad3x=TC21309、Ad4x=札幌95-0187、Ad8x=19751、Ad19x=V92-8266、Ad37x=TC-20850-1。

これらのアデノウイルスをPBSにてそれぞれ2μg/mlに調製し96穴マイクロタイタープレート(塩化ビニール製、住友ベークライト社、MS7196F)に50μl/well分注する。室温(22℃～26℃)1時間静置して感作した後、0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄し、1%BSA/PBSで37℃4時間ブロッキングする。この抗原感作プレートに、C9、C14、C27、C41の各抗体をPBSでIgG濃度0.1μg/mlに調製した溶液50μl/wellを分注し、室温(22℃～26℃)1時間反応させる。反応後、0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG(H+L)(MBL社CODE330)をPBSで2000倍に希釈し、50μl/wellを分注し、室温(22℃～26℃)1時間反応させ再び0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄する。ペルオキシダーゼの基質であるオルトフェニレンジアミン(opd)の錠剤(opd15mg、Na₂SO₄ 91.3mg、クエン酸6.8mg、Na₂CO₃ 16.9mgから成る)を0.015% H₂O₂を含むpH5.2の2M-Tris-クエン酸バッファー12mlに溶解したものを100μl/well分注して室温(22℃～26℃)30分発色させた後、2N-H₂SO₄ 100μl/wellを加えて反応を停止し、プレートリーダー(Molecular Devices Vmax)にて490nm-650nmでのOD値を測定した。抗アデノウイルスモノクローナル抗体のコントロールとして、<ケミコン社MAB8052>を用いた。MAB8052は、Ad3型で免疫して得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体であり、41種の血清型のアデノウイルスと反応する。クローン名は<20/11>。(参考文献：先行技術の記載のうち<1>、<2>...) 取得抗体に関しては、それぞれ3回ずつ試験を行い、平均値と標準偏差を算出した。得られた結果を表1～4に示す。結果の数値はOD490-650nmの値である。なお、抗体の代わりにPBSのみを抗原結合プレートに反応させた場合のバックグラウンド値は、何れも10mOD未満の値であったので、無視した。

0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG(H+L)(MBL社CODE330)をPBSで2000倍に希釈し、50μl/wellを分注し、室温(22℃～26℃)1時間反応させ再び0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄する。ペルオキシダーゼの基質であるオルトフェニレンジアミン(opd)の錠剤(opd15mg、Na₂SO₄ 91.3mg、クエン酸6.8mg、Na₂CO₃ 16.9mgから成る)を0.015% H₂O₂を含むpH5.2の2M-Tris-クエン酸バッファー12mlに溶解したものを100μl/well分注して室温(22℃～26℃)30分発色させた後、2N-H₂SO₄ 100μl/wellを加えて反応を停止し、プレートリーダー(Molecular Devices Vmax)にて490nm-650nmでのOD値を測定した。抗アデノウイルスモノクローナル抗体のコントロールとして、<ケミコン社MAB8052>を用いた。MAB8052は、Ad3型で免疫して得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体であり、41種の血清型のアデノウイルスと反応する。クローン名は<20/11>。(参考文献：先行技術の記載のうち<1>、<2>...) 取得抗体に関しては、それぞれ3回ずつ試験を行い、平均値と標準偏差を算出した。得られた結果を表1～4に示す。結果の数値はOD490-650nmの値である。なお、抗体の代わりにPBSのみを抗原結合プレートに反応させた場合のバックグラウンド値は、何れも10mOD未満の値であったので、無視した。

取得抗体に関しては、それぞれ3回ずつ試験を行い、平均値と標準偏差を算出した。得られた結果を表1～4に示す。結果の数値はOD490-650nmの値である。なお、抗体の代わりにPBSのみを抗原結合プレートに反応させた場合のバックグラウンド値は、何れも10mOD未満の値であったので、無視した。

【0010】

【表1】

クローン名	アデノウイルス血清型					
	3x	4x	8x	19x	37x	37p
C9 n=1	0.825	0.830	0.835	0.968	0.675	0.873
n=2	0.634	0.538	0.799	0.968	0.662	0.915
n=3	0.608	0.809	0.796	0.994	0.531	0.820
C9平均値	0.662	0.592	0.810	0.977	0.623	0.869
C9標準偏差	0.013	0.048	0.022	0.015	0.080	0.050
MAB8052	0.430	0.270	0.318	0.564	0.271	0.366

【0011】

【表2】

クローン名	アデノウイルス血清型					
	3x	4x	8x	19x	37x	37p
C 14 n=1	0.808	0.708	0.985	1.219	0.790	0.984
n=2	0.816	0.698	1.038	1.201	0.795	0.997
n=3	0.818	0.771	1.061	1.229	0.881	1.081
C 14 平均値	0.814	0.726	1.028	1.216	0.822	1.021
C 14 標準偏差	0.005	0.040	0.039	0.014	0.051	0.053
HAB8052	0.430	0.270	0.318	0.564	0.271	0.366

【0012】

【表3】

クローン名	アデノウイルス血清型					
	3x	4x	8x	19x	37x	37p
C 27 n=1	0.809	0.558	0.817	1.126	0.482	0.682
n=2	0.834	0.564	0.791	1.150	0.490	0.662
n=3	0.851	0.560	0.816	1.092	0.495	0.673
C 27 平均値	0.831	0.561	0.808	1.123	0.489	0.672
C 27 標準偏差	0.021	0.003	0.015	0.029	0.007	0.010
HAB8052	0.618	0.421	0.473	0.743	0.232	0.352

【0013】

【表4】

クローン名	アデノウイルス血清型					
	3x	4x	8x	19x	37x	37p
C 41 n=1	0.899	0.862	1.096	1.465	0.791	0.925
n=2	0.932	0.854	1.087	1.397	0.760	0.940
n=3	0.876	0.770	1.003	1.378	0.756	0.888
C 41 平均値	0.902	0.829	1.062	1.413	0.769	0.918
C 41 標準偏差	0.028	0.051	0.051	0.046	0.019	0.027
MAB8052	0.618	0.421	0.473	0.743	0.232	0.352

【0014】以上の結果から、取得したモノクローナル抗体C9、C14、C27、C41の何れもアデノウイルスに対してMAB8052と同等以上の反応性を有し、本発明者等の実施した測定条件では、Ad37x型に対してはMAB8052では0.3未満のOD値であるのに対して、何れの抗体も0.4以上のOD値が得られる事が判った。また、Ad37p型に対しては、MAB8052が0.4未満のOD値であるのに対して何れの抗体も0.6以上のOD値、Ad4x型に対しては、MAB8052が0.45未満のOD値であるのに対して何れの抗体も0.5以上のOD値、Ad8x型に対しては、MAB8052が0.5未満のOD値であるのに対して何れの抗体も0.7以上のOD値、Ad19x型に対しては、MAB8052が0.8未満のOD値であるのに対して何れの抗体も0.9以上のOD値を示した。よって、C9、C14、C27、C41の4種類の取得抗体は何れもMAB8052よりアデノウイルスに対して高い反応性を示し、最もOD値が低いAd37x型に対しても0.40OD以上の吸光度を示す事が明らかとなった。これらのOD値は、上記測定条件で測定したものであるが、本質的には、抗原結合プレートに、50 μ lの抗体溶液を反応させ、ペルオキシターゼ標識抗マウスIgGとその基質であるオルトフェニレンジアミンにより発色させるELISA法により測定したものである。

【0015】方法2

蛍光抗体法

不活化していないアデノウイルスとの反応性を確認する為に以下の実験を行った。C9、C14、C27、C41をPBSで希釈し、10種類のアデノウイルス血清型(1p、3p、4p、5p、6p、7p、8p、11p、19p、37p)の各抗原をそれぞれスライドガラス上に塗抹し、37℃60分湿潤箱中でインキュベートする。FITC標識抗マウスIgGを添加し37℃60分インキュベーションし、洗浄後、蛍光顕微鏡にて検鏡。蛍光が認められたものを陽性とする。抗体の希釈濃度は、Ad3pで明らかに蛍光が認められる以下の最終濃度まで各抗体をPBSで希釈して10種類のアデノウイルス血清型と反応させた(C9: 12.0 μ g/ml, C14: 5.3 μ g/ml, C27: 5.3 μ g/ml, C41: 12.2 μ g/ml)。その結果、上記濃度のC9、C14、C27、C41の何れの抗体においても、Ad1p、3p、4p、5p、6p、7p、8p、11p、19p、37pの10種類の全ての抗原と反応性が認められた。さらに、C9、C14、C27、C41がアデノウイルス以外のウイルスや細菌と交差反応を起こすか否かを確認する為、上記蛍光抗体法を用いて表5に示すウイルスおよび細菌との反応を行った。抗体価が1未満の場合つまり下記の抗体原液濃度で反応性が認められなかったものを陰性とみなした[C9(770 μ g/ml) C14(680 μ g/ml) C27(670 μ g/ml) C41(780 μ g/ml)]。

【0016】

【表5】

ウイルス	C 9	C 14	C 27	C 41
ヒトヘルペスウイルス 1 型	<1	<1	<1	<1
ヒトヘルペスウイルス 2 型	<1	<1	<1	<1
エンテロウイルス 70 型	<1	<1	<1	<1
コクサッキーウイルス A 24 変異株	<1	<1	<1	<1
クラミジアトラコマティス	<1	<1	<1	<1

【0017】このことから、C9、C14、C27、C41はアデノウイルス以外の上記ウイルスおよび細菌とは反応性を有しないことが確認できた。以上の結果より、得られたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体C9、C14、C27、C41は、いずれも実施例で用いた全てのアデノウイルスと反応し、かつアデノウイルス以外のウイルスおよび細菌とは反応しなかった。

【0018】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体、具体的には、C9、C14、C27、C41と命名したモノクローナル

抗体は、いずれもアデノウイルスに特異的な反応性を有するモノクローナル抗体であり、市販アデノウイルスモノクローナル抗体MAB8052と比較してアデノウイルスとの反応性は高く、一定の条件のELISA法において、0.4 OD_{490nm}より高い吸光度を示すものである。また、本発明のモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を用いた広範囲の血清型のアデノウイルスの検出法(EIA法、RIA法、蛍光抗体法、免疫拡散法、免疫電気泳動法、その他これらの変法、応用を含む)のいずれにも使用できるものであり、高い感度を得られるものでもある。

フロントページの続き

(72)発明者 伊藤 典彦
神奈川県横浜市南区永田山王台21-17
(72)発明者 大野 重昭
神奈川県横浜市金沢区富岡西141-10
(72)発明者 青木 功喜
北海道札幌市白石区本通五丁目北南4-3

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12
DA15
4B065 AA90X AA95Y AB04 BA08
BD15 CA25 CA46
4H045 AA11 AA30 DA76 EA53 FA72
GA15 GA26